

(様式 1-1)

提出日：2022 年 4 月 27 日

2021 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

研究成果報告書

(1) 事業名（下記より該当事業名を選択し、ほかは削除して下さい。）

クライオ電子顕微鏡

(2) 研究代表者

氏名：浅田秀基

所属機関名・部局名・職名：京都大学大学院医学研究科・分子細胞情報学・特定准教授

(3) 研究課題名（申請時に記載したものと同一課題名を記入して下さい。）

スフィンゴシン-1-リン酸受容体 3 (S1PR3) の構造解析

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：加藤 貴之（研究室名：電子線構造生物学）

(5) 研究成果の概要（公開）

S1PR3 (Sphingosine-1-Phosphate Receptor 3)は、脂質メディエーターである d18:1 S1P と結合することで血管新生など多岐にわたる機能を有している。S1PR3 が持つ多様な生理機能は、異なる Gα サブユニットを持つ 3 量体 G タンパク質と共役することで得られると考えられている。我々は X 線結晶構造解析から d18:1S1P が結合した S1PR3 の構造を決定したが、生理機能と構造の関係をより明確にするためには G タンパク質が共役した構造を決定することが必要であり、そのためには cryo-EM 単粒子解析が有用であると考えられた。

現在、多くの GPCR の cryo-EM 単粒子解析の成功例が既にあり、我々もそれらの手法に従って検討を行った。特に S1PR3 の C 末端側に LgBiT、G_β に HiBiT を結合し、これらを含む全ての分子を共発現させる Tethering system と呼ばれる方法で d18:1 S1P-S1PR3-miniG_{qβγ} 複合体を発現・精製することに成功した。この複合体を用いて阪大蛋白研の Titan Krios で測定を

を行い、24 時間の測定から 4,392 枚の動画を取得した。Relion と cryoSPRk を用いた解析の結果、取得した動画から 1,348,385 個の粒子が得られ、最終的に 3.34Å の構造が得られた。この構造において、Gq と S1PR3 の結合様式および脂質メディエーターである d18:1 S1P と S1PR3 の結合様式を明らかにすることに成功した。

	S1PR3-DNminiG _{qβγ} -S1P complex
Data collection	
Magnification	105,000
Microscope	Titan Krios
Voltage (kV)	300
Electron exposure (e-/Å ²)	50
Defocus range (μm)	-0.8 – -2.0
Corrected Cs (mm)	0.079
Data processing	
Software	CryoSparc v3.3.1
Micrographs (no.)	4,392
Initial particle images (no.)	1,348,385
Final particle images (no.)	72,981
Symmetry	C1
Map resolution (Å)	3.34
FSC threshold	0.143